

$$\frac{A_05}{56}$$



Alessandro Pini

# **Anticorpi e peptidi**

I farmaci del XXI secolo



Copyright © MMXI  
ARACNE editrice S.r.l.

[www.aracneeditrice.it](http://www.aracneeditrice.it)  
[info@aracneeditrice.it](mailto:info@aracneeditrice.it)

via Raffaele Garofalo, 133/ A-B  
00173 Roma  
(06) 93781065

ISBN 978-88-548-4060-7

*I diritti di traduzione, di memorizzazione elettronica  
di riproduzione e di adattamento anche parziale,  
con qualsiasi mezzo, sono riservati per tutti i Paesi.*

*Non sono assolutamente consentite le fotocopie  
senza il permesso scritto dell'Editore.*

I edizione: maggio 2011

# Indice

- 7 *Prefazione*
- 9 **Capitolo I**  
*Introduzione*
- 13 **Capitolo II**  
*Gli anticorpi. Struttura, funzione e genetica*
- 2.1. Introduzione agli anticorpi, 13 – 2.2. Struttura degli anticorpi, 15 – 2.3. Le classi degli anticorpi, 18 – 2.4. Legame anticorpo–antigene, 21 – 2.5. Organizzazione dei geni delle immunoglobuline, 22 – 2.6. Regolazione della ricombinazione mediante sequenze specifiche, 28 – 2.7. Regolazione trascrizionale dei geni degli anticorpi, 30 – 2.8. Maturazione di affinità, 31 – 2.9. Commutazione di classe, 32 – 2.10. I frammenti anticorpali, 33 – 2.11. Riferimenti bibliografici, 35.
- 37 **Capitolo III**  
*Peptidi. Definizione, struttura, isolamento e stabilità*
- 3.1. Introduzione ai peptidi, 37 – 3.2. Definizione e struttura dei peptidi, 38 – 3.3. Emivita e stabilità in vivo, 39 – 3.4. Librerie di peptidi, 41 – 3.5. Peptidi come farmaci, 42 – 3.6. Riferimenti bibliografici, 43.
- 45 **Capitolo IV**  
*Affinità di legame*
- 4.1. Definizione di affinità e importanza a fini terapeutici, 45 – 4.2. Misurazione dell'affinità di legame, 48 – 4.3. Riferimenti bibliografici, 51.
- 53 **Capitolo V**  
*Le tecniche di isolamento di anticorpi e peptidi*
- 5.1. La tecnologia dell'ibridoma, 53 – 5.2. Il 'phage display', 57 – 5.2.1. Il

*batteriofago M13*, 59 – 5.2.2. *Fagemidi e vettori fagici*, 61 – 5.2.3. *Costruzione di librerie fagiche di frammenti anticorpali*, 66 – 5.2.4. *Costruzione di librerie fagiche di peptidi*, 71 – 5.2.5. *Strategie di selezione delle librerie fagiche ('panning')*, 73 – 5.2.6. *Strategie alternative di esposizione di proteine su superfici biologiche*, 77 – 5.3. *Maturazione di affinità degli anticorpi ricombinanti*, 78 – 5.3.1. *Maturazione dell'affinità intrinseca*, 79 – 5.3.2. *Maturazione di avidità*, 80 – 5.4. *Riferimenti bibliografici*, 83.

85 **Capitolo VI**

*Anticorpi bispecifici e immuconiugati*

6.1. *Anticorpi bispecifici*, 85 – 6.2. *Immuconiugati, Immunotossine, Immunocitochine*, 86 – 6.3. *Riferimenti bibliografici*, 89.

91 **Capitolo VII**

*Gli anticorpi in clinica*

7.1. *Rituxan™*, 93 – 7.2. *Remicade®*, 94 – 7.3. *Avastin™*, 95 – 7.4. *Herceptin®*, 96 – 7.5. *Humira™*, 96 – 7.6. *Riferimenti bibliografici*, 97.

99 **Capitolo VIII**

*I peptidi in clinica*

8.1. *Hematide™*, 100 – 8.2. *Kalbitor®*, 100 – 8.3. *Nplate™*, 101 – 8.4. *Riferimenti bibliografici*, 102

## Prefazione

La ricerca scientifica nel campo bio-medico è volta alla scoperta degli intimi meccanismi che regolano i processi biologici con l'obiettivo finale di alleviare le pene dovute alle malattie. I settori oggetto dello studio dei ricercatori bio-medici possono essere grossolanamente sintetizzati come segue: l'identificazione dei meccanismi di funzionamento dei sistemi biologici (cellule e interazioni molecolari), l'individuazione di marcatori diagnostici e terapeutici (molecole presenti nei tumori, nei microrganismi e nei processi infiammatori), e l'identificazione e produzione di molecole a scopo diagnostico, preventivo e terapeutico (i farmaci). In questo libro saranno affrontati i principali aspetti relativi ai farmaci terapeutici, ed in particolare ai farmaci biotecnologici di nuova generazione basati su molecole peptidiche e anticorpali.

La ricerca di nuovi farmaci terapeutici si sta sempre più rivolgendo alla identificazione di molecole capaci di bersagliare in maniera più specifica possibile un dato marcatore patologico, con l'obiettivo finale di colpire solo ed esclusivamente quelle cellule che trasportano quel marcatore, senza portare danni collaterali a tutti quei distretti dell'organismo ancora sani. Gli anticorpi, e da qualche tempo anche i peptidi, sono universalmente riconosciuti come le migliori molecole capaci di svolgere questa attività di proiettili selettivi e sempre più farmaci basati su queste molecole stanno entrando nella pratica clinica. In questo libro saranno affrontati i principali aspetti relativi alla identificazione, produzione e sviluppo di queste molecole, portando esperienze dirette dell'autore e degli scienziati di tutto il mondo operanti in questo campo. Sarà dato inoltre un particolare rilievo alla tecnologia oggi più sfruttata per l'identificazione di nuovi peptidi e anticorpi: il "phage display". Prima dell'avvento della moderna biotecnologia la maggior parte dei farmaci veniva sviluppata attraverso

una combinazione di procedure di sintesi chimica e di screening sistematici di composti complessi generalmente presenti in natura nelle piante e nei microrganismi. L'avvento delle tecniche biotecnologiche ha aperto nuove strade all'identificazione di farmaci utilizzando in molti casi la chimica e la biologia combinatoriale e il disegno molecolare in silico. In particolare, la biologia combinatoriale permette di disporre oggi di grandi librerie di molecole da cui è possibile pescare selettivamente il composto desiderato e di identificarlo mediante appropriati strumenti di rivelazione. Il phage display, tecnologia messa a punto negli anni 80 del secolo scorso, è certamente una delle tecnologie più usate nel campo della biologia combinatoriale, sfruttando la possibilità di esporre molecole di natura proteica sulla superficie di virus batterici, i fagi.

Saranno qui descritti i dettagli che permettono di costruire librerie "fagiche" di peptidi e anticorpi insieme ai principali metodi utilizzati per selezionare i ligandi specifici presenti in tali librerie. Saranno inoltre descritti alcuni anticorpi e peptidi che sono stati identificati con questa tecnologia e che sono diventati farmaci usati nella pratica clinica o che si trovano attualmente nelle fasi precliniche o cliniche di sperimentazione prima dell'approvazione da parte degli enti internazionali preposti all'immissione in commercio dei farmaci.

Questo testo è rivolto agli studenti e agli studiosi che operano nel campo della biotecnologia, segnatamente nel settore della biologia combinatoriale e nell'identificazione e sviluppo di farmaci biotecnologici sotto forma di anticorpi ricombinanti e peptidi.

Mi auguro che questo lavoro, ancorché modesto, possa aiutare parte della comunità scientifica a comprendere più approfonditamente una tecnologia che si sta rivelando di importanza cruciale per l'industria biofarmaceutica, e che possa essere di stimolo ai giovani scienziati che hanno intenzione, con il loro entusiasmo e la loro dedizione, di giocare un qualsiasi ruolo nella difficile partita contro le malattie.



## Introduzione

Agli inizi del XX secolo lo scienziato tedesco Paul Ehrlich propose il concetto di proiettile magico (“magic bullet”) riferendosi a molecole del sistema immunitario capaci di bersagliare selettivamente i marcatori patologici. A quel tempo ancora non erano noti gli anticorpi e lui fu uno dei primi ad ipotizzare l’esistenza di queste molecole che chiamò in un primo momento recettori. Gli studi di immunologia dei primissimi anni del XX secolo permisero di identificare in maniera più dettagliata le molecole che Erlich chiamava recettori e, al giorno d’oggi, gli anticorpi, dal punto di vista strettamente molecolare, non hanno praticamente più segreti da rivelare.

La possibilità di sfruttare dei proiettili magici per colpire selettivamente cellule malate o microrganismi è sempre stato il desiderio più ambito da tutti gli operatori biomedici, ma le possibilità di identificare molecole che si adattassero bene a questo scopo sono state limitatissime fino a tempi molto recenti. Tra la fine dell’800 e l’inizio del 900, si cercò di sfruttare la capacità degli animali di produrre anticorpi in grande quantità. A questo scopo, animali come cavalli e buoi venivano immunizzati con uno specifico agente infettivo (batterio o virus), dopo un certo periodo di tempo venivano salassati e il sangue veniva lavorato per ottenere un preparato sufficientemente puro, e contenente gli anticorpi specifici, per combattere la malattia la cui etiologia era dovuta allo stesso agente usato per l’immunizzazione dell’animale. Il siero ottenuto veniva cioè iniettato a pazienti che in molti casi trovavano un giovamento dovuto all’azione biologica degli anticorpi esogeni. Questa procedura, che nel nostro tempo ci appare approssimativa e priva dei minimi requisiti di sicurezza al giorno d’oggi necessari per un farmaco, ha invece permesso per gran

parte del secolo XX, di salvare centinaia di migliaia di vite umane e ha fatto sì che si sviluppassero le prime industrie di farmaci a scopo preventivo: gli istituti sieroterapici. Oggi sappiamo bene che questa procedura comporta dei rischi enormi perché le immunoglobuline di origine non umana sono antigenicamente diverse da quelle da noi prodotte e quindi immunogene, e soprattutto perché, nonostante che i sistemi di purificazione si siano molto evoluti, le malattie da siero dovute alla somministrazione di sieri animali possono ancora essere un grave problema per la salute dei riceventi. La somministrazione di sieri animali è stata quindi molto limitata man mano che le conoscenze sulla biologia fornivano informazioni relative ai rischi di tali protocolli. A metà degli anni 70 due scienziati operanti al Medical Research Council di Cambridge in Inghilterra, Cesar Milstein e Georges Kohler, misero a punto una tecnica che permetteva di produrre in laboratorio colture continue di cellule esprimenti anticorpi a specificità predeterminata: la tecnologia degli anticorpi monoclonali, detta anche tecnologia dell'ibridoma. Questa tecnica laboratoristica, di cui si parlerà in dettaglio in seguito, è considerata il primo protocollo veramente biotecnologico sfruttato per la produzione di molecole con potenzialità farmaceutica. La tecnologia dell'ibridoma ha rivoluzionato la ricerca, con un impatto sulla comunità scientifica enorme. Basti pensare che oggi la maggior parte dei reagenti di laboratorio usati in tutto il mondo sono anticorpi ottenuti con questa tecnica. I due scienziati furono insigniti del premio Nobel ma la tecnica dell'ibridoma non fu mai brevettata. Questa cosa al giorno d'oggi appare impensabile considerando come la biotecnologia si muove nel mondo dei mercati finanziari. Gli anticorpi monoclonali sembrarono in un primo momento la soluzione ai problemi degli effetti collaterali della sieroterapia classica e il concetto di "proiettile magico" riprese vigore. Si pensò cioè che si potessero produrre con relativa facilità in vitro, ed in grande scala, anticorpi contro specifici marcatori patologici da poter usare per la cura delle più gravi malattie infettive o tumorali. Il problema dell'immunogenicità però non era ancora risolto in quanto gli anticorpi monoclonali potevano essere prodotti solo dopo immunizzazione di un animale da cui venivano prelevate le cellule del sistema immunitario facendole crescere, dopo

appropriata immortalizzazione, in laboratorio. Quindi, gli anticorpi prodotti erano, e tutt'ora sono, di natura animale. L'entusiasmo iniziale si spense dopo che gli scienziati si resero conto che l'utilizzo di queste molecole rimaneva quindi limitatissimo. Almeno fino agli anni 80 del XX secolo, periodo in cui si cominciarono ad applicare le moderne tecniche di ingegneria genetica alle molecole del sistema immunitario, permettendo di creare degli ibridi anticorpali formati in parte da porzioni proteiche di origine animale ed in parte di origine umana, e quindi con ridotta immunogenicità. Questi anticorpi chimerici o umanizzati sono degli anticorpi ottenuti con la tecnologia dell'ibridoma, e quindi di origine animale, a cui si sostituisce gran parte della struttura molecolare (tranne quella che lega l'antigene) con strutture molecolari di origine umana. Tali anticorpi sono entrati nella pratica clinica da alcuni anni e sempre un numero maggiore di anticorpi chimerici o umanizzati stanno entrando nelle fasi di sviluppo e produzione per la commercializzazione.

Un ulteriore sviluppo ai proiettili magici si è avuto applicando agli anticorpi le tecniche di biologia molecolare e combinatoriale, segnatamente la tecnica del 'phage display' di cui parleremo estensivamente in questo libro. Una spinta enorme a questo processo è stata data dal lavoro del gruppo di ricerca di uno scienziato britannico, anche lui operante al Medical Research Council di Cambridge in Inghilterra: Sir Greg Winter. Egli ha enormemente contribuito a fare luce sui dettagli delle strutture molecolari degli anticorpi e ha portato significativi miglioramenti nelle conoscenze dei geni delle immunoglobuline. In pratica è stato uno dei pionieri di quella tecnica che oggi viene chiamata 'ingegnerizzazione' degli anticorpi. La tecnologia cioè che, tramite l'ingegneria genetica, permette di costruire, a partire da geni umani, frammenti di anticorpi capaci di avere proprietà di legame identiche agli anticorpi interi. Questi frammenti possono essere trasformati in vere e proprie immunoglobuline in modo da costruire in laboratorio anticorpi completamente umani. Nell'anno 2004 è uscito in commercio il primo anticorpo monoclonale completamente umano derivato dal phage display: il farmaco Humira per la cura dei sintomi dell'Artrite reumatoide. La possibilità di costruire enormi librerie combinatoriali di questi frammenti anticorpali, da cui

è possibile 'pescare' l'anticorpo con la specificità desiderata, ha quindi portato la comunità scientifica, e di conseguenza l'intera umanità, molto vicino al concetto di proiettile magico.

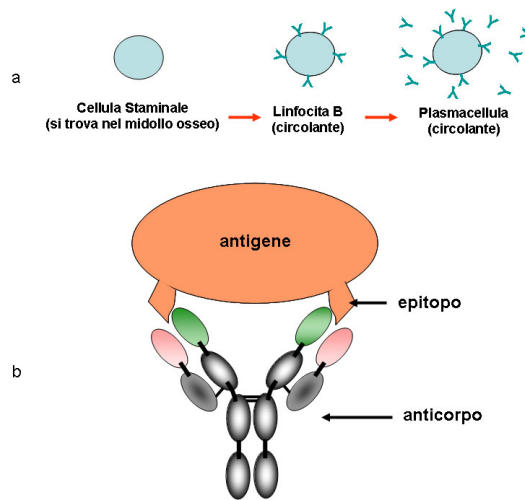
La comunità scientifica non si è comunque fossilizzata sugli anticorpi per la ricerca di farmaci selettivi. Sono infatti al vaglio degli scienziati molte molecole di tipo diverso che, insieme agli anticorpi, possono avere la capacità di bersagliare selettivamente le malattie. Allo stato attuale le molecole di origine proteica a breve sequenza aminoacidica, i peptidi, sembrano essere i più ragionevoli candidati a mimare le proprietà di legame tipiche degli anticorpi. In realtà i peptidi non posseggono quelle proprietà biologiche tipiche degli anticorpi che noi conosciamo come funzioni effettrici cioè le funzioni che, dopo che è avvenuto il legame, distruggono il bersaglio riconosciuto. Oggi comunque queste funzioni possono essere conferite artificialmente ai peptidi mediante la coniugazione o fusione con specifiche molecole che svolgono una determinata funzione effettrice. I peptidi possono quindi essere considerati degli anticorpo-mimetici. È da molto tempo che i peptidi vengono studiati per questi scopi ma alcuni inconvenienti ne hanno, fino a pochi anni fa, limitato il loro utilizzo. Oggi, grazie a nuove tecniche per la modificazione molecolare in laboratorio, la sintesi chimica, e, al solito, grazie alle tecniche combinatoriali che sfruttano grandi librerie molecolari, i peptidi stanno assumendo un ruolo sempre più rilevante nella produzione di farmaci selettivi. In questo libro saranno quindi prese in considerazione anche queste molecole fornendo informazioni circa la loro identificazione, sviluppo e sintesi, portando anche degli esempi di peptidi attualmente nelle fasi più avanzate dello sviluppo farmaceutico.

## Gli anticorpi. Struttura, funzione e genetica

SOMMARIO: 2.1. Introduzione agli anticorpi, 13 – 2.2. Struttura degli anticorpi, 15 – 2.3. Le classi degli anticorpi, 18 – 2.4. Legame anticorpo–antigene, 21 – 2.5. Organizzazione dei geni delle immunoglobuline, 22 – 2.6. Regolazione della ricombinazione mediante sequenze specifiche, 28 – 2.7. Regolazione trascrizionale dei geni degli anticorpi, 30 – 2.8. Maturazione di affinità, 31 – 2.9. Commutazione di classe, 32 – 2.10. I frammenti anticorpali, 33 – 2.11. Riferimenti bibliografici, 35.

### **2.1. Introduzione agli anticorpi**

Gli anticorpi sono una componente del sistema immunitario che è costituito da un articolato sistema di interazioni molecolari e cellulari finalizzato alla protezione dagli agenti esterni al corpo. Dal punto di vista biochimico gli anticorpi sono delle glicoproteine appartenenti alla classe delle gamma–globuline dette immunoglobuline, ed i termini “anticorpo” e “immunoglobulina” vengono generalmente usati come sinonimi. Il sistema immunitario viene convenzionalmente suddiviso in “immunità umorale” ed “immunità cellulo mediata”. In realtà i due sistemi sono strettamente collegati, comunque si può dire che il primo sistema sottende alla produzione da parte dei linfociti B di molecole, gli anticorpi appunto, capaci di legare ed eliminare gli agenti estranei, ed il secondo all’attivazione di cellule, i linfociti T, capaci di distruggere le cellule infettate o malate. I linfociti prendono origine da una cellula staminale comune (pluripotente) che si trova nel midollo osseo. Questa cellula staminale nel corso della sua vita va incontro ad una maturazione che la porta a circolare nel sangue e nei fluidi corporei come linfocita B o linfocita T. La cellula staminale che diventa linfocita B, durante la sua maturazione inizia a subire



**Figura 1.** (a), schema di differenziamento da cellula staminale a plasmacellula. (b), schema del riconoscimento di un antigene da parte di un anticorpo. L'epitopo è la regione dell'antigene legata dall'anticorpo.

dei cambiamenti radicali, tanto che ad un certo punto produce una specifica immunoglobulina che viene esposta sulla superficie cellulare funzionando come un recettore. La cellula a questo stadio è considerata un linfocita B maturo. Quando l'anticorpo sulla superficie della cellula incontra la sua specifica molecola bersaglio, l'antigene, il linfocita si attiva, prolifera e va incontro ad un ulteriore differenziamento diventando un nuovo tipo cellulare, la plasmacellula, che produce anticorpi solubili in grande quantità (Figura 1a). Un linfocita B, e tutti i suoi cloni derivati dall'attivazione, produce una grande quantità dello stesso anticorpo che prende il nome di "anticorpo monoclonale". Un anticorpo monoclonale riconosce un singolo determinante antigenico, o epitopo, sulla superficie di un intero antigene. In pratica un antigene è ciò che stimola il sistema immunitario a produrre anticorpi, l'epitopo è invece quella porzione di antigene che entra in diretto contatto con il sito di legame dell'anticorpo (Figura 1b). Con il termine aptene si intende invece una molecola molto piccola che viene riconosciuta dagli anticorpi ma, al contrario dell'antigene, non è in grado di scatenare una risposta immunitaria.

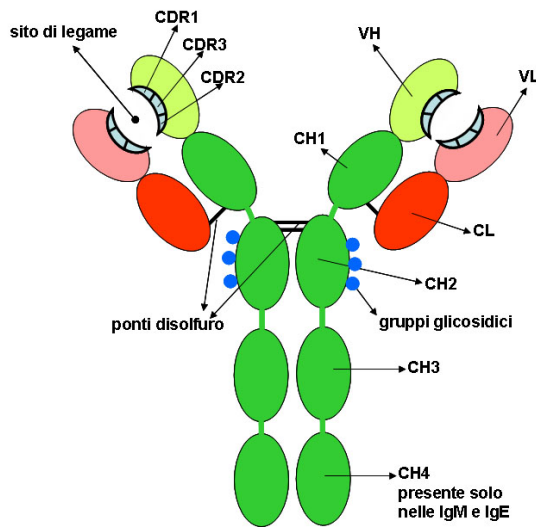


Figura 2. Struttura schematica di un anticorpo

## 2.2. Struttura degli anticorpi

Un classico anticorpo visto al microscopio elettronico mostra una evidente struttura a Y. Gli anticorpi sono formati da quattro polipeptidi distinti, uguali due a due, legati tra loro da ponti disolfuro. Tutti i domini delle immunoglobuline hanno una struttura secondaria a foglietto- $\beta$ . Il peso molecolare di una singola immunoglobulina varia da tipo a tipo (vedi sotto) aggirandosi intorno ai 150 KDa. In ogni anticorpo ci sono due catene pesanti identiche e due catene leggere identiche (Figura 2). Le catene pesanti sono divise in quattro o, in alcuni casi, cinque domini: VH (Variable Heavy), CH<sub>1</sub> (Constant Heavy 1), CH<sub>2</sub>, CH<sub>3</sub> e, quando presente, CH<sub>4</sub>. Nel dominio CH<sub>2</sub> si trovano i siti di glicosilazione a cui si attaccano i gruppi glicosidici che rendono gli anticorpi delle glicoproteine. Le catene leggere sono divise in due domini: VL (Variable Light) e CL (Constant Light). L'estremità amino-terminale si trova in VH e VL e quella carbossi-terminale in CL e in CH<sub>3</sub>, o in CH<sub>4</sub> quando questo è presente. Le regioni VH e VL sono quelle deputate al riconoscimento antigenico e sono carat-

terizzate da una forte variabilità aminoacidica tra anticorpi diversi. All'interno di queste regioni si trovano tre zone ad enorme variabilità aminoacidica dette regioni ipervariabili o CDR (Complementarity Determining Region). Le porzioni di proteina che stanno tra le varie CDR si chiamano regioni "framework" e sono molto meno variabili rispetto alle CDR. Le tre CDR della VH si ripiegano insieme alle tre CDR della VL in modo da formare la regione dell'anticorpo che lega l'antigene. Questa regione è detta sito di riconoscimento antigenico o sito di legame, oppure, con una terminologia ormai desueta, "paratopo". Il sito di riconoscimento antigenico permette ad ogni anticorpo di avere una specifica complementarità con un singolo epitopo. Ogni singolo anticorpo ha due siti di legame per lo stesso epitopo ed è quindi bivalente.

Le parti costanti delle catene pesanti e delle catene leggere non hanno la funzione di legare l'antigene ma hanno una cruciale importanza strutturale e mostrano diverse proprietà biologiche, dette funzioni effettrici, concentrate nella porzione Fc dell'anticorpo, cioè la porzione di proteina identificata con il gambo della Y (Tabella 1). Esistono diversi tipi di regioni costanti che definiscono le differenti proprietà biologiche. Ci sono due tipi di CL, le catene  $\kappa$  e  $\lambda$ , e cinque isotipi di CH, le catene  $\mu$ ,  $\gamma$ ,  $\alpha$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ . I diversi isotipi di CH definiscono le classi degli anticorpi che sono IgM, IgG, IgA, IgD e IgE.

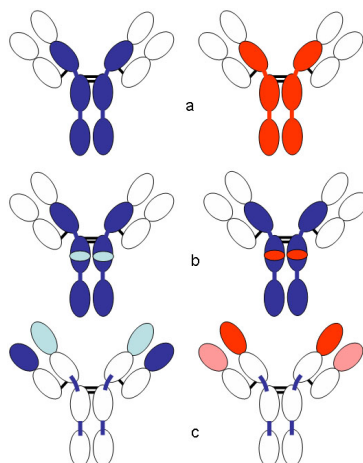
Ogni isotipo deriva da un gene diverso codificante per la regione C (Figura 3a). Le differenze nelle regioni costanti dovute all'uso di un allele rispetto all'altro vengono invece definite come allelotipiche, quindi il termine "allelotipo" o "allotipo" definisce un anticorpo derivato dal gene (allele) presente in uno dei due cromosomi omologhi e non nell'altro (Figura 3b). Il concetto di idiotipo è invece relativo a differenze dovute a particolari associazioni VH e VL e riguarda quindi solo la parte variabile dell'anticorpo, compreso il sito di legame (Figura 3c). Quando si parla di anticorpo anti-idiotipo si intende un anticorpo (per chiarezza chiamiamolo Ig<sub>1</sub>) che riconosce un altro anticorpo (Ig<sub>2</sub>) nella sua parte variabile, e, nel caso in cui l'epitopo idiotipico di Ig<sub>2</sub> sia formato proprio dal sito di legame e non dal resto della parte variabile, si dice che l'anticorpo anti-idiotipo



**Tabella 1.** Principali caratteristiche e funzioni effettrici delle immunoglobuline (Ig).

	<i>IgG</i>	<i>IgA</i>	<i>IgM</i>	<i>IgD</i>	<i>IgE</i>
<i>Principali caratteristiche</i>	Ig più abbondanti nei fluidi corporei interni dove combattono i microorganismi e le loro tossine	Ig presenti nelle mucose dove proteggono le superfici esterne corporee	Agglutinanti molto efficaci, sono prodotti nella risposta immunitaria primaria, sono la prima linea difensiva contro la batteriemia	Praticamente presenti solo sulla superficie dei linfociti B	Mediano la secrezione di citochine. Sono prodotte nelle infezioni da parassiti. Sono responsabili dei sintomi allergici
<i>Fissazione del complemento</i>					
<i>Via classica</i>	++	-	+++	-	-
<i>Via alternativa</i>	-	+	-	-	-
<i>Attraversamento placenta</i>	++	-	-	-	-
<i>Legame a mastociti e basofili</i>	-	-	-	-	++
<i>Legame a macrofagi e polimorfonucleati</i>	+++	+	-	-	+

Legenda: +++ eccellente attività. ++ buona attività. + attività percepibile. - nessuna attività.



**Figura 3.** Differenze tra isotipi (a). Differenze tra allelotipi (b). Differenze tra idiotipi (c)